

Фёрстеровский перенос электронной энергии в биомолекулах с внутренними вращениями флуоресцентных меток

**А. П. Блохин¹⁾, С. А. Тихомиров¹⁾, А. С. Пилипович¹⁾, Phung Viet Tiep²⁾,
Pham Hong Minh²⁾**

¹⁾ Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларусь, Минск, Беларусь,
e-mail: h.pilipovich@ifanbel.bas-net.by

²⁾ Институт физики, Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой, Вьетнам.

Предложен обобщённый метод расчёта кинетики фёрстеровского переноса энергии электронного возбуждения между флуоресцентными метками нежёстко связанными с биомолекулами. Рассчитаны временные зависимости переноса от ориентации диполей донора и акцептора на поверхности биомолекул и скоростей внутренней вращательной диффузии. Исследован перенос энергии между флуоресцентными молекулярными роторами SYBRGreen интеркалированными в двуцепочечные фрагменты ДНК от концентрации и вязкости растворов.

Ключевые слова: фёрстеровский резонансный диполь-дипольный перенос энергии; ориентационный фактор; внутримолекулярная вращательная диффузия.

Förster electron energy transfer in biomolecules with internal rotations of fluorescent labels

**A. P. Blokhin¹⁾, S. A. Tikhomirov¹⁾, A. S. Pilipovich¹⁾, Phung Viet Tiep²⁾,
Pham Hong Minh²⁾**

¹⁾ B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: h.pilipovich @imapb.bas-net.by

²⁾ Institute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam.

A generalized method for calculating the kinetics of Förster electron excitation energy transfer between fluorescent labels non-rigidly bound to biomolecules is proposed. The time dependences of the transfer on the orientation of the donor and acceptor dipoles on the surface of biomolecules and the rates of internal rotational diffusion were calculated. The energy transfer between SYBRGreen fluorescent molecular rotors intercalated into double-stranded DNA fragments was studied depending on the concentration and viscosity of the solutions.

Keywords: Förster resonant dipole-dipole energy transfer; orientation factor, intramolecular rotational diffusion.

Введение

Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) важный метод в биофизике для определения меж- и внутримолекулярных расстояний в диапазоне 1–10 нм и относительной ориентации структурных элементов биомолекул. FRET является широко используемым методом анализа структуры биополимеров (ДНК, аминокислот, углеводов, дендримеров) [1]. Скорость FRET в общем виде можно определить произведением

$$w_{12} = c_{12} \kappa^2 ,$$

скалярного параметра c_{12} , зависящего от расстояния между центрами диполей и спектрально-оптических характеристик конкретного эксперимента, и ориентационного фактора:

$$\kappa^2 = ((\mathbf{d} \cdot \mathbf{a}) - 3(\mathbf{d} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{a} \cdot \mathbf{r}))^2, \quad (1)$$

где $\mathbf{d}, \mathbf{a}, \mathbf{r}$ - единичные векторы, соответственно, вдоль дипольных моментов переходов донора, акцептора и направления от центра донора к акцептору. Ориентационный фактор является важнейшей характеристикой, в сильной степени зависящей от динамики быстрых внутренних поворотов доноров и акцепторов в молекулярных комплексах. Этот параметр меняется в пределах от 0 до 4 и вносит наибольшую неопределенность при определении структур биомолекул методами флуоресцентной спектроскопии с использованием FRET. Скорость переноса энергии из-за внутренних поворотов донора и акцептора установлена для флуоресцентных меток связанных с молекулами ДНК с хорошо известной структурой и местом привязки, а также для закрепленных на биомолекулах через длинный линкер [1]. Для описания вклада внутренней вращательной подвижности донора и акцептора в скорость переноса в данной работе предложен метод представления ориентационного фактора через тензорные ориентационные корреляционные функции [2, 3].

1. Временные зависимости FRET

В разработанном подходе, как показано путём представления выражения для ориентационного фактора в виде неприводимых тензоров и последующих преобразований получено выражение [2, 3]

$$\begin{aligned} \kappa^2(\Omega_1(t), \Omega_2(t), \Omega_r(t)) = & \frac{2}{3}(1 + \frac{1}{5} \sum_{m=-2}^2 D_{m0}^2(\Omega_1(t)) D_{m0}^{2*}(\Omega_2(t)) + \\ & + \sum_{m=-2}^2 (D_{m0}^2(\Omega_1(t)) + D_{m0}^2(\Omega_2(t))) D_{m0}^{2*}(\Omega_r(t)) - \\ & - \sum_{m_1, m_2=-2}^2 C_{2020}^{20} C_{2m_1 2m_2}^{2m} D_{m_1 0}^2(\Omega_1(t)) D_{m_2 0}^2(\Omega_2(t)) D_{m_0}^{2*}(\Omega_r(t)) + \\ & + 6 \sum_{m_1, m_2=-2}^2 C_{2020}^{40} C_{2m_1 2m_2}^{4m} D_{m_1 0}^2(\Omega_1(t)) D_{m_2 0}^2(\Omega_2(t)) D_{m_0}^{4*}(\Omega_r(t))), \end{aligned} \quad (2)$$

где $C_{2m_1 2m_2}^{jm}$ – коэффициенты Клебша-Гордана, $D_{k0}^j(\Omega_i(t))$ – функции Вигнера, определяющие компоненты неприводимых тензоров углами $\Omega_{i=1,2}(t) - \Omega_{d,a}(t)$, $\Omega_r(t)$ для $\mathbf{d}, \mathbf{a}, \mathbf{r}$. Используя (1), можно получить обобщённое выражение для описания временной кинетики ориентационного фактора через ориентационные корреляционные функции, для которых разработаны и используются диффузионные модели молекулярного вращения, в том числе и для внутренних вращений. Наиболее популярна модель внутренней азимутальной диффузии, в которой векторы \mathbf{d}, \mathbf{a} совершают диффузию с коэффициентами D_1, D_2 по азимутальным углам $\varphi_1(t), \varphi_2(t)$ в конусах с углами раствора η_1, η_2 . Ориентация конусов диффузии донора и акцептора относительно вектора \mathbf{r} определяются углами ξ_1, ψ_1 и ξ_2, ψ_2 (рис. 1).

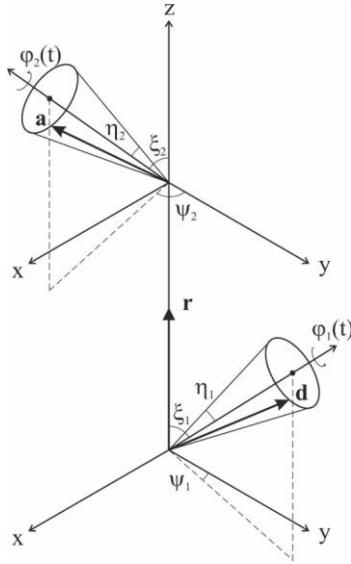


Рис. 1. Углы ориентации векторов $\mathbf{d}, \mathbf{a}, \mathbf{r}$ в молекулярной системе координат x, y, z в модели свободной вращательной азимутальной диффузии

Если выбрать ось z молекулярной системы параллельно вектору \mathbf{r} , после усреднения по углам можно получить выражение для расчёта временной кинетики ориентационного фактора

$$\kappa^2(t) = \frac{2}{3} + \frac{2}{3} F_0(\xi_1, \eta_1, t) + \frac{2}{3} F_0(\xi_2, \eta_2, t) + 2F_0(\xi_1, \eta_1, t)F_0(\xi_2, \eta_2, t) - 4\cos\psi F_1(\xi_1, \eta_1, t)F_1(\xi_2, \eta_2, t) + \frac{1}{2}\cos 2\psi F_1(\xi_1, \eta_1, t)F_1(\xi_2, \eta_2, t), \quad (3)$$

где $F_0(\xi_i, \eta_i, t) = d_{00}^2(\xi_i)d_{00}^2(\eta_i) - 3\sin\xi_i\cos\xi_i\sin\eta_i\cos\eta_ie^{-D_it} + \frac{3}{4}\sin^2\xi_i\sin^2\eta_ie^{-4D_it}$,

$$F_1(\xi_i, \eta_i, t) = \sin\xi_i\cos\xi_id_{00}^2(\eta_i) + (2\cos^2\xi_i - 1)\sin\eta_i\cos\eta_ie^{-D_it} - \frac{1}{2}\sin\xi_i\cos\xi_i\sin^2\eta_ie^{-4D_it},$$

$$F_2(\xi_i, \eta_i, t) = \sin^2\xi_id_{00}^2(\eta_i) + 2\sin\xi_i\cos\xi_i\sin\eta_i\cos\eta_ie^{-D_it} + \frac{1}{2}(\cos^2\xi_i + 1)\sin^2\eta_ie^{-4D_it},$$

$$d_{00}^2(\beta) = (3\cos^2\beta - 1)/2, \psi = \psi_1 - \psi_2.$$

На практике при внедрении флуоресцентных меток в сложные биомолекулярные объекты условия внутренней диффузии для донора и акцептора обычно полагают совпадающими $\xi_1 = \xi_2 = \xi, \eta_1 = \eta_2 = \eta$. На рис. 2 приведены рассчитанные временные зависимости ориентационного фактора в редуцированных единицах ($D_1 = D_2 = 1$) для ориентации осей диффузационных конусов $\xi = 90^\circ, 80^\circ, 70^\circ$ при увеличении угла раствора диффузационных конусов донора и акцептора η от 0° до 50° (кривые 1–6 на рисунках слева – a, b, d) и η от $54,7^\circ$ до 90° (кривые 1–5 на рисунках справа – c, e).

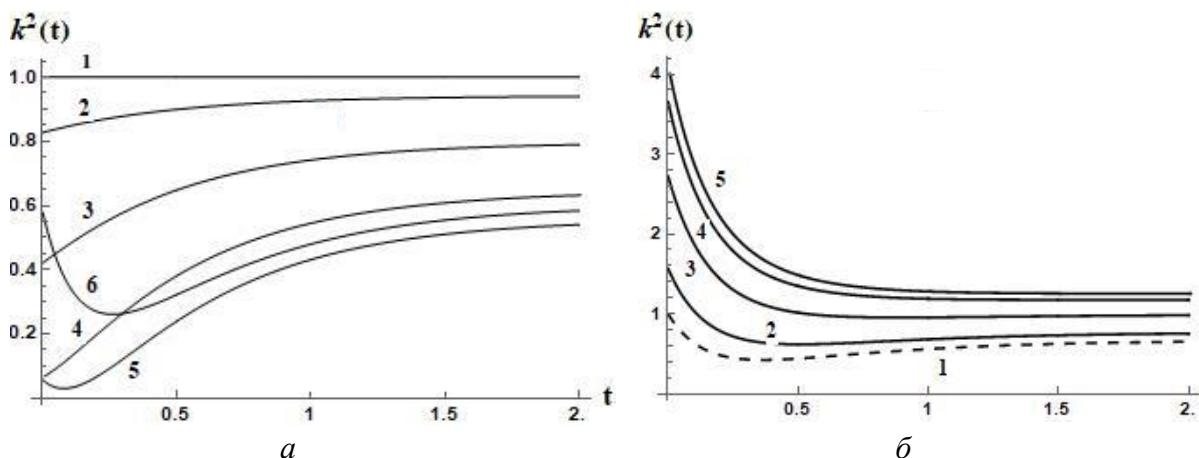


Рис. 2. Кинетика ориентационного фактора $k^2(t)$ в редуцированных единицах времени и $D_1 = D_2 = 1$ при $\xi = 90^\circ$ и $\eta = 0^\circ$ (кривая 1), 10° (кривая 2), 20° (кривая 3), 30° (кривая 4), 40° (м5), 50° (кривая 6)

Как видно из рисунков, кинетика ориентационного фактора существенным образом зависит от углов ориентации диполей и скоростей диффузии. Наблюдаются переходы между режимами падения и возрастания, а эффективность переноса, может как уменьшаться, так и увеличиваться в ходе поворотов донора и акцептора. При некоторых значениях углов в начальный момент времени перенос энергии отсутствует $k^2(0) \approx 0$, но затем возникает. Это можно объяснить переходом от неблагоприятного расположения ориентаций донора и акцептора к более выгодному.

2. FRET в донорно-акцепторных парах флуоресцентных меток в ДНК

Для ДНК с внедрёнными флуоресцентными метками естественно выбрать молекулярную систему координат с осью z вдоль длинной оси ДНК параллельно вектору \mathbf{r} . Как известно, на эффективность переноса энергии между флуоресцентными метками связанными с молекулами ДНК существенно влияет подвижность ориентация диполей донора и акцептора в местах их привязки [1]. Векторы диполей у флуоресцентных меток в ДНК обычно совершают внутреннюю диффузию примерно перпендикулярно оси z , т. е. $\xi_i \approx \pi/2$. При переходе от донора к акцептору вдоль спирали ДНК ось диффузационного конуса акцептора повернута на угол ψ . Как видно из рис. 3 *a*, *б*, *в*, *г*, характер зависимостей самым существенно меняется при повороте значений $\psi = 30^\circ, 60^\circ, 90^\circ, 180^\circ$. Для объяснения резкого падения анизотропии флуоресценции из-за фёрстеровского внутримолекулярного переноса энергии для коротких фрагментов ДНК предложена модель учитывающая, как внутренние повороты, так и вращательную диффузию молекулярного комплекса в целом [2]. Разработанный метод, использован для определения скоростей фёрстеровского переноса энергии и коэффициентов вращательной диффузии флуоресцентных молекулярных роторов SYBR Green интеркалированных и двуцепочечных ДНК- dsDNA с 10, 20 и 100 парами оснований от их относительной концентрации в растворах, а также от вязкости среды в ДНК.

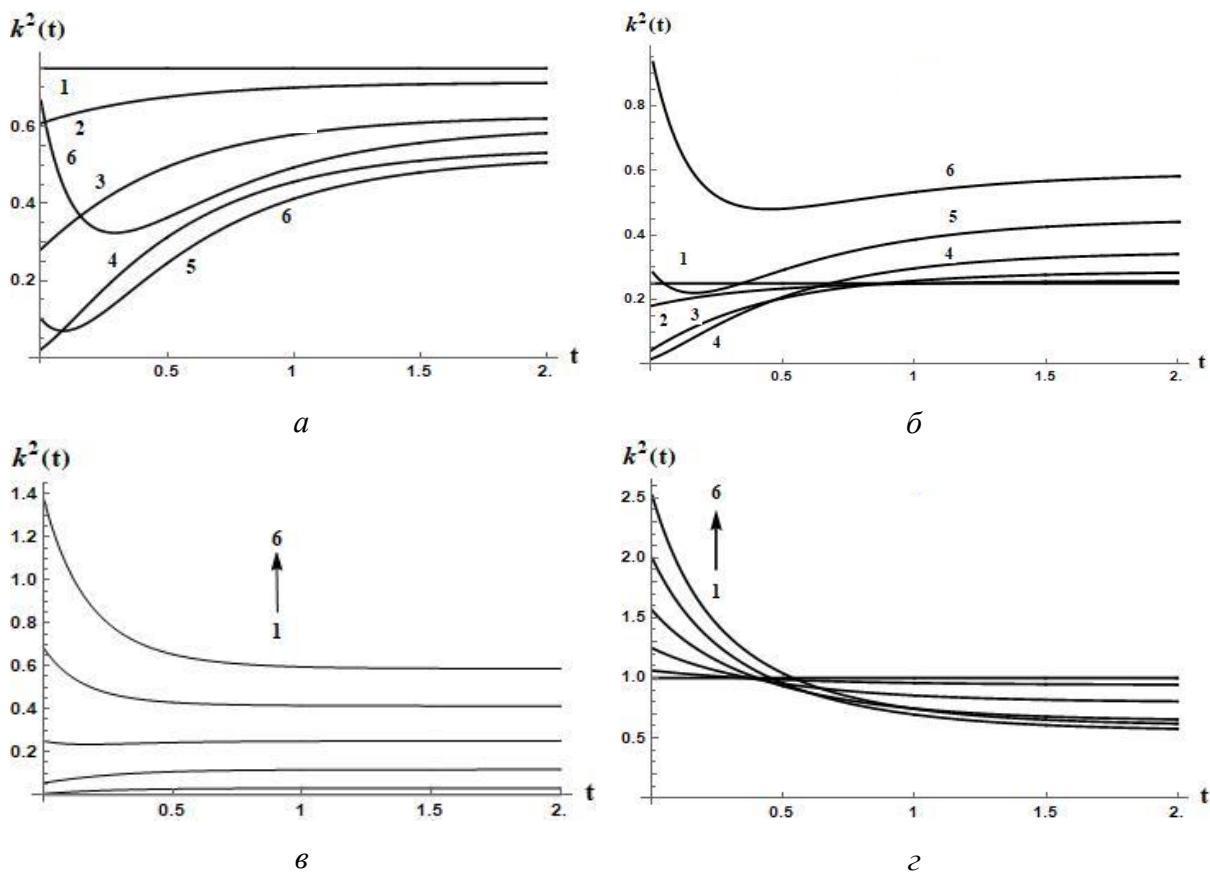


Рис.3. Кинетика ориентационного фактора $k^2(t)$ для углов $\xi = 90^\circ$:

a – $\psi = 30^\circ$; δ – $\psi = 60^\circ$; γ – $\psi = 90^\circ$; ε – $\psi = 180^\circ$.

$\eta_i = 0^\circ$ (кривая 1), 10° (кривая 2), 20° (кривая 3), 30° (кривая 4), 40° (кривая 5), 50° (кривая 6)

Заключение

Поскольку точность определения величины ориентационного фактора в значительной степени задаёт и точность определения из эксперимента фёрстеровского радиуса переноса энергии для контроля структуры биомолекул, разработанный метод актуален для повышения информативности флуоресцентных методик на основе FRET. Измерение кинетических зависимостей может быть важным источником информации о происходящих процессах в местах локации флуоресцентных меток.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф24В-006) и Вьетнамской Академией наук и технологий (QTBY01.03/24-25).

Библиографические ссылки

1. Van der Meer B. Forster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications / B. W. Van der Meer, D. M. Van der Meer, S. S. Vogel; – I. L. Medintz, N. Hildebrandt, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2013.
2. Резонансный перенос энергии между молекулярными роторами SYBRGreen интеркалированными в ДНК / С. А. Тихомиров [и др.] // Журн. прикл. спектр. 2023. Т. 90. С. 202–210.
3. Влияние внутренней вращательной диффузии флуоресцентных меток на временную кинетику ориентационного фактора фёрстеровского переноса энергии / А. П. Блохин [и др.] // Журн. прикл. спектр. 2025. Т. 92. С. 293–302.